

University of Groningen

Interaction between the gut and its microbiota in inflammatory bowel disease

Sadaghian, Mehdi

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Sadaghian, M. (2015). *Interaction between the gut and its microbiota in inflammatory bowel disease*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

APPENDICES

Nederlandse Samenvatting

Acknowledgements

List of publication

Appendices

Nederlandse Samenvatting

Het menselijke darmstelsel wordt gekoloniseerd door de microbiota, een collectieve omschrijving van alle micro-organismen. In de darm zijn er wel tien keer meer cellen van micro-organismen dan humane cellen¹⁻³. Deze microbiota bestaat voor het merendeel uit bacteriën, maar bevat ook cellen uit de twee andere domeinen van levende wezens, eukaryoten (cellen met een kern) en archaea (een aparte groep van prokaryoten die net als bacteriën geen celkern hebben). Samen vormen deze een complex ecosysteem waarvan de samenstelling wordt beïnvloed door verschillende elementen: gastheerfactoren zoals leeftijd, gezondheidstoestand en genetische opmaak, maar ook omgevingsfactoren zoals dieet, antibiotica en roken⁴⁻⁷.

De relatie tussen de microbiota en het menselijk lichaam als gastheer kan op verschillende wijzen gedefinieerd worden. De intestinale microbiota heeft een grote invloed op de darmgezondheid, omdat het daar de balans handhaaft en nutriënten en energie biedt voor de gastheer door onverteerd voedsel om te zetten in bruikbare stoffen^{8,9}. Daarnaast spelen darmmicrobiota, hun metaboliëten en cel componenten een grote rol in de ontwikkeling en rijping van een functioneel afweersysteem, zowel het aangeboren als het verworven (of adaptieve) immuunsysteem. Bovendien zijn de microbiota betrokken bij de ontwikkeling van tolerantie voor “goede bacteriën” en het weghouden van “slechte bacteriën”, wat nodig is voor de handhaving van de balans tussen de microbiota in de darm onderling en tussen de microbiota en het immuunsysteem in de darm. Een gebrek aan tolerantie of een stoornis in het immuunsysteem kan ernstige consequenties hebben voor de gastheer, zoals bijvoorbeeld een chronische inflammatoire darmziekte, de ziekte van Crohn of colitis ulcerosa. De interactie met het immuunsysteem kan direct zijn, waarbij de microbiota (of bestanddelen van microbiota) in direct contact komen met darmepitheelcellen en cellen van het immuunsysteem. Maar het kan ook via een indirecte interactie gaan, doordat microbiota in de darm producten en metaboliëten produceren die door het slijmvlies in de darm wordt opgenomen. Daarom speelt de locatie van de verschillende bacteriën in de darm ten opzichte van de epitheelcellen een cruciale rol in de ontwikkeling van het (mucosale) immuunsysteem en in ziekte en gezondheid van de gastheer.

Het onderzoek wat in dit proefschrift wordt beschreven heeft als doel om de interactie tussen de darmmicrobiota en de gastheercellen te ontrafelen. In eerste instantie is de ecologie van de veelvoorkomende darmbacterie *Faecalibacterium prausnitzii* in de ontlasting van gezonde vrijwilligers onderzocht. Vervolgens is de wisselwerking tussen deze bacterie en de gastheer onderzocht. Welke mechanismen in de gastheer bevorderen de groei van deze “goede bacterie”. En welke potentiële anti-inflammatoire eigenschappen heeft deze bacterie op de gastheer. Ten slotte is de wisselwerking tussen microbiota in een gastheer met een chronische darmontsteking onderzocht. Hierbij onderzochten wij de invloed van erfelijke factoren in relatie tot symbiotische “goede” microbiota en bacteriën

Nederlandse Samenvatting

die bij ons horen maar ziekteverwekkers kunnen worden, de zogenaamde patho-symbionten.

Na een inleidend hoofdstuk wordt in **Hoofdstuk 2** het onderzoek beschreven naar de locatie van verschillende bacteriële groepen in menselijke ontlasting, de zogenaamde “biostructuur” van een drol. De aanwezigheid van darmbacteriën in relatie tot andere poep bestanddelen werd in beeld gebracht door aan ontlasting stukjes lichtgevend DNA fragmentjes toe te voegen (fluorescentie *in situ* hybridisatie met probes) die verschillende bacteriegroepen herkennen. Hier werden specifieke probes gebruikt die de “goede bacteriën” *F. prausnitzii* en *Roseburia* herkennen. Deze twee bacteriesoorten produceren boterzuur, een vetzuur dat gunstige effecten heeft op de darmgezondheid¹⁰. Dit onderzoek toonde aan dat *F. prausnitzii*, welke 5 tot soms wel 25% van de totale hoeveelheid bacteriën van gezonde mensen uitmaakt, vooral aan de buitenkant van een drol aanwezig is, een plek dat vooral in contact komt met het darmepitheel. *F. prausnitzii* zat veel vaker aan de buitenkant van een drol dan *Roseburia*, welke 3 tot 15% van de totaal aanwezige bacteriën uitmaakt. Verder laten we zien dat er minstens 3 verschillende fylogenetische groepen *F. prausnitzii* voorkomen in menselijke ontlasting. Tot nu toe zijn er nog maar 2 van deze fylogroepen buiten het menselijk lichaam in het laboratorium in kweek gebracht. We laten zien dat *F. prausnitzii* fylogroep 2 zich vooral aan de buitenkant van de darm -en dus dicht bij het darmepitheel- bevindt, terwijl fylogroep 1 door de hele drol aanwezig is. Een onderverdeling van bacteriegroepen op basis van hun locatie in de poep is eerder door Swidsinski *et al.* beschreven, waarin 3 groepen worden onderscheiden: 1) bacteriën die voornamelijk in het lumen verblijven, 2) bacteriën die de slijmlaag dicht bij het darmepitheel koloniseren en 3) bacteriën die op beide locaties groeien, de zogenaamde feco-mucus bacteriën. *F. prausnitzii* zou dus tot deze laatste groep behoren, hoewel er wel verschillen zijn tussen subgroepen van deze bacterie. Onze observaties zijn in overeenstemming met de bevindingen van Swidsinski *et al.* en laten zien dat faecalibacterium in de gehele ontlasting verspreid voorkomt maar dat fylogroep 2 het meest aanwezig is op de grens tussen de ontlasting en de mucuslaag die in contact staat met het darmepitheel.

Een belangrijk aspect van de microbiota-gastheer interactie is dat de verschillende bacteriële groepen uit de microbiota in staat zijn om voedseldeeltjes te verteren, vooral polysachariden en voedingsvezels, om op die manier energie in de vorm van voedingsstoffen te leveren aan de gastheer. Een hogere activiteit van deze bacteriën kan bijdragen aan een hogere productie voedingsstoffen zoals kort keten vetzuren, waarvan boterzuur hier het meest van belang is omdat het een energiebron is voor de epitheelcellen. *F. prausnitzii*, *Clostridium* groep XIVa-bacteriën en *Roseburia* zijn de meest belangrijke boterzuur producenten in de menselijke darm. Onze bevindingen in **Hoofdstuk 2** laten zien dat deze bacteriën een biofilm vormen rondom specifieke voedseldeeltjes. De biofilm rond

Appendices

voedseldeeltjes wordt in bijna alle gevallen gevormd door *Clostridium* groep XIVa en *Roseburia* als onderdeel daarvan. Dit in tegenstelling tot *F. prausnitzii* welke alleen op zeer specifieke deeltjes groeide die meestal juist niet door *Clostridium* groep XIVa en *Roseburia* gekoloniseerd werden. De bacteriën in deze biofilm werden geïdentificeerd met een universele *F. prausnitzii* probe, maar reageerden niet altijd met de twee fylogroep-specifieke probes, wat suggereert dat er een derde fylogroep *F. prausnitzii* bestaat, welke vooral voedingsvezels kan koloniseren. Tot slot vonden we in **Hoofdstuk 2** dat in vrijwilligers een toename van het aantal *F. prausnitzii* aan de oppervlakte van een drol vaak samenging met de afname -of zelfs afwezigheid- van enterobacteriën, zoals de gewone maar pathosymbionte *E. coli*. Andersom hadden de poep van vrijwilligers met *E. coli* microkolonies in de buitenste laag van de ontlasting juist minder *F. prausnitzii* op die plek. Khan *et al.* hebben laten zien dat *F. prausnitzii* stam A2-165, een stam representatief voor fylogroep 2, het vermogen heeft om aan de zuurstofarme kant van een gradiënt tussen zuurstofrijke en zuurstofloze omstandigheden te groeien. Dit zouden ze kunnen door thiolen (zwavel-waterstof verbindingen zoals cysteïne) te gebruiken als elektronen acceptor via extracellulair elektron overdracht. Hiervoor worden de elektronen die vrijkomen bij de afbraak van glucose overgedragen op flavines, zoals riboflavine, die dit als redox mediators doorgeven aan cysteïne. Het feit dat fylogroep 2 van *F. prausnitzii* vooral aan de buitenkant van de drol werd gevonden geeft aan dat deze bacteriën flavines gebruiken om op plekken te verblijven waar zuurstof uit de bloedcirculatie aanwezig is. Riboflavine kan dus als redox mediator gebruikt worden door faecalibacteriën en zo de groei hiervan stimuleren op zuurstofrijke-zuurstofarme grensvlakken zoals die in de darm aanwezig zijn. Riboflavine, oftewel vitamine B2, zit in verschillende voedingswaren zoals zuivel, vlees en groenten. In **Hoofdstuk 3** hebben we een experiment gedaan om het principe aan te tonen dat door de inname van riboflavine het aantal *F. prausnitzii* bacteriën in de ontlasting toeneemt. De resultaten laten inderdaad een toename zien van faecalibacteriën in ontlasting van gezonde vrijwilligers die 14 dagen lang 100 mg riboflavine per dag oraal innamen. Deze toename werd gevonden in 8 van de 11 vrijwilligers en was voor beide fylogroepen gelijk en daarmee werden de bevindingen van Khan *et al.* bevestigd. Wat opviel was dat ook de hoeveelheid *Roseburia* toenam na riboflavine gebruik. In laboratorium experimenten wordt de groei van *Roseburia* bacteriën niet gestimuleerd door riboflavine omdat deze bacteriën riboflavine niet als elektronen overdrachts-molecuul kunnen gebruiken. Hoe *Roseburia* dan wel indirect of direct profiteert van riboflavine is op dit moment nog onduidelijk.

Eerdere studies hebben aangetoond dat de ziekte van Crohn is geassocieerd met lagere aantallen faecalibacteriën en meer “slechte” adherente invasieve *E. coli* (AIEC) in de darm^{11,12}. In **Hoofdstuk 3** hebben we laten zien dat na riboflavine inname een toename in de aantallen boterzuurvormers zoals *F. prausnitzii* gekoppeld is aan een afname in het aantal

Nederlandse Samenvatting

enterobacteriën. Dit bevestigt de gevonden negatieve correlatie tussen de twee bacteriën die gezien was in **Hoofdstuk 2**. Als we te weten komen hoe riboflavine de hoeveelheid enterobacteriën verlaagd kunnen we misschien de overmatige groei van deze pathosymbiotische *E. coli* bacteriën tegen gaan. Dit zou een goede behandeling kunnen zijn voor patiënten met chronische darmontsteking, maar ook om een uitbraak van pathogene enterobacteriën, zoals de zeer pathogene Enterohemorragische *E. coli* (EHEC) bacterie te bestrijden. Het feit dat 1) enterobacteriën bij voorkeur dicht bij het epitheel groeien, 2) AIEC een rol spelen in de pathogenese van de ziekte van Crohn en 3) faecalibacteriën de unieke eigenschap hebben om het fecale-mucosale grensgebied te koloniseren, ondersteunt onze hypothese dat het stimuleren van *F. prausnitzii* groei belangrijk is voor het verkrijgen van een gezonde darm. Eén reden waarom *F. prausnitzii* een gunstig effect op de darm heeft is omdat het ontstekings-remmende eigenschappen heeft¹³. Ontsteking leidt tot oxidatieve stress in het darmepitheel en dit kan de groei van zuurstof-tolerante pathosymbionten zoals *E. coli* stimuleren. Juist een toename van anti-inflammatoir *F. prausnitzii* op deze plek zal de groei van *E. coli* beperken en daarmee het ontstekingsproces in het darmepitheel indammen. *F. prausnitzii* is een strikt anaerobe bacterie en gaat dus dood in direct contact met zuurstof. *F. prausnitzii* moet de door ontsteking veroorzaakte oxidatieve stress dan wel kunnen overleven anders krijgen pathosymbionten zoals *E. coli* de overhand. De omgekeerde evenredigheid van deze twee populaties is vaker aangetoond door Harmsen *et al.* en Willings *et al.* die een afname van *F. prausnitzii* zagen en een toename van *E. coli* bij mensen met de ziekte van Crohn. Dit alles geeft de potentie aan van het gebruik van riboflavine voor de ondersteuning van de behandeling van patiënten met chronische darmontstekingen, vooral in de remissie (of onderhouds-) fase als de darmontsteking en oxidatieve stress geen acute problemen geven. De bovenstaande bevindingen laten zien dat de anti-inflammatoire eigenschappen van *F. prausnitzii* gebaseerd kunnen zijn op verschillende mechanismen. Het kan een onderdrukkend effect hebben op bacteriën zoals *E. coli*, of het kan een effect zijn van de verhoogde productie van metabolieten zoals boterzuur door de faecalibacteriën. Het positieve effect van boterzuur is ook al aangetoond in muizen die lijden aan een ontsteking in de dikke darm¹⁴. Om de interactie tussen darmepitheelcellen en darmmicroben beter te leren begrijpen is het belangrijk dat er naast diermodellen ook nieuwe methoden in het laboratorium worden ontwikkeld waarin deze directe interactie bestudeerd kan worden. Er zijn verschillende experimentele “*in-vitro*” modellen ontwikkeld waarbij (an)aerobe bacteriën en darmepitheelcellen samen gekweekt kunnen worden^{13,14}. Dit is bijzonder lastig omdat de epitheelcellen zuurstof nodig hebben terwijl anaerobe bacteriën juist doodgaan als er (minuscule hoeveelheden) zuurstof aanwezig is.

In **Hoofdstuk 4** hebben we een systeem ontwikkeld om de zuurstof-afhankelijke darmepitheelcellen (Caco-2 cellen) en de extreem zuurstofgevoelige anaerobe *F. prausnitzii*

Appendices

samen te kweken. Dit “Human oxygen-Bacteria- anaerobic” (HoxBan) co-kweek-systeem laat deze twee celtypen gedurende ten minste 36 uur naast elkaar groeien. Vooral de toename van groei van *F. prausnitzii* vlakbij de Caco-2 cellen in de zuurstofrijke-zuurstofarme overgangszone is heel erg vergelijkbaar met wat we in de menselijke darm hebben gevonden (Hoofdstuk 2) en maakt dit systeem uitermate geschikt om de interactie tussen deze bacterie en darmepitheelcellen nader te bestuderen. Onze bevindingen in **Hoofdstuk 4** tonen de anti-oxidatieve stress en anti-inflammatoire eigenschappen van groeiende *F. prausnitzii* cellen op Caco2-cellen aan. De specifieke toename van *F. prausnitzii* in de zuurstofrijke-zuurstofarme overgangszone zoals beschreven door Khan *et al.*¹⁵ was ook aanwezig in het HoxBan systeem en deze groei was vooral sterk dicht bij de Caco-2 darmepitheelcellen. Deze toegenomen aantallen *F. prausnitzii* in co-kweek met Caco-2 cellen toont aan dat de darmepitheel cellen op een of andere manier een positief effect hebben op de groei van de (anaerobe) bacterie. Deze positieve interactie is mogelijk het gevolg van zuurstof-consumptie door de Caco-2 cellen wat gunstig is voor de zuurstofmijdende faecalibacteriën en/of de productie van prebiotische stoffen.

De anti-inflammatoire effecten van *F. prausnitzii* op Caco-2 cellen bleek uit de verlaagde expressie van IL-1 β en iNOS in de darmepitheelcellen, iets wat nog niet eerder in co-kweek systemen aangetoond kon worden, omdat er geen levende bacteriën werden gebruikt¹³. Verder werd ook de expressie van genen die reageren op oxidatieve stress, zoals heme oxygenase 1 (HO-1), onderdrukt in het co-kweek systeem. Dit alles ondersteunt de hypothese dat *F. prausnitzii* anti-oxidatieve en anti-inflammatoire eigenschappen heeft.

In **Hoofdstuk 4** werd ook een exo-metaboolanalyse verricht. Dit is een analyse van een groot aantal stoffen/metabolieten in het medium na verschillende HoxBan co-kweek condities. Hiermee kan bekeken worden welke stoffen specifiek worden geconsumeerd of juist geproduceerd (en uitgescheiden) onder de verschillende condities. Hoewel er veel meer *F. prausnitzii* bacteriën aanwezig zijn in co-kweek met Caco-2 cellen, werd er geen verhoogde concentratie boterzuur gemeten, in vergelijking met een *F. prausnitzii* kweek zonder Caco-2 cellen. Mogelijk komt dit doordat boterzuur als primaire energiebron wordt geconsumeerd door de Caco-2 darmepitheelcellen¹⁶. Wel werd er in het co-cultuur systeem meer mierenzuur (formiaat) gemaakt, mogelijk omdat er meer bacteriën groeiden die dit maken terwijl dit i.t.t. boterzuur niet wordt verbrand door Caco-2 cellen. Onze experimenten tonen aan dat het HoxBan systeem een ideaal platform is voor de analyse van infectie/inflammatie modellen, waarmee het effect van patho-symbiontische bacteriën, zuurstof radicalen of inflammatoire cytokines op de communicatie van bacteriën met de darmepitheelcellen geanalyseerd kan worden.

De ziekte van Crohn en colitis ulcerosa zijn de belangrijkste vormen van chronische darmontsteking (inflammatory bowel disease, IBD) in de mens. IBD ontstaat als gevolg van een complex samenspel tussen factoren als genetische vatbaarheid, omgevingsfactoren,

Nederlandse Samenvatting

darm microbiota en het immuunsysteem. In een gezonde darm zorgt het immuunsysteem ervoor dat pathogenen en pathosymbionten niet in de mucosa doordringen, terwijl het de normale commensale bacteriën tolereert. Een disbalans tussen de activiteit van het immuunsysteem en microbiota kan tot ontsteking van de darmwand leiden. Recente genoom-wijde associatie studies hebben 163 loci in ons genoom aangetoond die met chronische darmontsteking geassocieerd zijn¹⁷. Het is helaas nog niet bekend hoe genoomvarianten het microbioom kunnen beïnvloeden^{18,19}. Eén van die loci is *ATG16L1* welke een belangrijke factor is in de aangeboren immuniteit en is onder andere betrokken bij fagocytose van micro-organismen in de darm. Het eiwit gecodeerd door dit gen is namelijk betrokken bij de intracellulaire afbraak van pathogenen nadat ze in afweercellen door fagocytose opgenomen zijn in zogenaamde fagosomen. Een speciale variant van *ATG16L1*, namelijk *ATG16L1-T300A*, heeft als gevolg dat gefagocyteerde materiaal niet goed wordt afgebroken en daarmee geeft deze variant een verhoogde kans op de ziekte van Crohn²⁰⁻²³. In **Hoofdstuk 5** hebben we de relatie bestudeerd tussen het *ATG16L1* genotype van patiënten met de ziekte van Crohn en de bacteriële samenstelling van ontstoken en niet-ontstoken slijmvlies van het laatste deel van de dunne darm. Dit deel, het terminale ileum, staat via een klep in verbinding met de dikke darm. De bacteriële samenstelling is bepaald door middel van “pyro-sequentie” analyse van de aanwezige 16S rRNA genen. Onze resultaten tonen aan dat de microbiële samenstelling van bipten van ontstoken terminaal ileum anders is in patiënten die homozygoot zijn voor de beschermende genvariant (het *ATGL16L1-T300* allel) in vergelijking met patiënten die homozygoot drager zijn van de risico genvariant (het *ATG16L1-T300A* allel). Opvallend genoeg werd dit verschil niet gevonden in het niet-ontstoken slijmvlies van dezelfde patiënten, dus er is een specifieke relatie met ontsteking. De patiënten met de ziekte van Crohn die het risico allel bezitten zijn niet goed in staat om pathosymbionten, zoals *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* en *Fusobacteriaceae*, tijdens ontsteking op te ruimen. Bij patiënten met het beschermende allel zijn deze pathosymbionte bacteriën minder aanwezig, wat suggereert dat deze wel opgeruimd kunnen worden. Daarnaast waren bij patiënten met het beschermende allel meer *Lachnospiraceae* aanwezig in vergelijking met dragers van het risico allel. Helaas geven de resultaten niet aan of de pathosymbionten de ontsteking veroorzaakt hebben of dat ze het gevolg zijn van de ontsteking. De resultaten uit **Hoofdstuk 5** komen overeen met die van Neut *et al.*²⁴ welke beschreef dat een toename van de voornoemde pathosymbionten gerelateerd is aan een snellere terugkeer van de ziekte van Crohn na verwijdering van een ziek stuk terminaal ileum. Om het effect van het *ATG16L1* genotype op fagocytose van pathosymbionten beter te kunnen besturen werd in **hoofdstuk 5** ook de mate van overleving van AIEC (adherente invasieve *E. coli*) in monocytën geïsoleerd uit het bloed van gezonde vrijwilligers met het beschermende of het risico *ATG16L1* allel onderzocht. Om de ontsteking in de darm na te bootsen werden deze

Appendices

monocyten geactiveerd tot macrofaag door deze bloot te stellen aan ontstekingsfactoren, zoals IL-1 β , TNF α en PMA. Vervolgens werden de bacteriën toegevoegd en bepaald hoe goed de macrofagen in staat waren om deze te doden. De resultaten hiervan bevestigde de *in vivo* experimenten in de darmbiopten, want bij de monocytten met het risico allel overleefden meer AIEC dan bij monocytten met het beschermende allel. Dit verschil was er niet als de monocytten niet een “ontstekingsfenotype” hadden. Kennelijk hebben de monocytten die het risicogen dragen vooral moeite met het verwerken van pathogenen als ze in een omgeving van ontsteking geactiveerd zijn.

Zoals eerder genoemd spelen de darmmicrobiota een cruciale rol bij de ontwikkeling van het immuunsysteem en de ontwikkeling van tolerantie voor bepaalde bacteriesoorten. Een afwijking in deze tolerantie kan leiden tot ontsteking zoals aanwezig bij de ziekte van Crohn. Onder normale condities zijn deze immuunreacties gericht tegen pathosymbionten, zoals *E. coli*, om deze te elimineren²⁵. Het is niet bekend waartegen de immuunreacties en de ontsteking bij chronische darmontstekingsziekten gericht is. Feit is dat het vaak om langdurige ontsteking gaat waarbij de integriteit van de darm aangetast is, de darm is in feite een beetje lek. Dit leidt tot een verhoogde passage van bacteriën en allergenen door het epitheel naar het onderliggende weefsel en de bloedbaan, wat weer kan leiden tot een afwijkende immuunreactie²⁶. Een veel voorkomende immuunreactie is de vorming van antistoffen tegen darmbacteriën. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 6** gekeken of er bacteriën in de ontlasting zitten die herkend worden door specifieke antistoffen van het type Immunglobuline G (IgG). Daarvoor hebben we IgG uit het serum van patiënten met een darmontsteking samengevoegd bij bacteriën uit hun eigen ontlasting. Om de binding van IgG aan darmbacteriën te detecteren hebben we magnetisch gelabelde antistoffen tegen IgG gebruikt om de aan IgG gebonden bacteriën te kunnen isoleren. De bacteriële samenstelling van IgG gebonden fractie en de niet IgG gebonden fractie van de ontlasting hebben we bepaald met Illumina sequentie analyse van de aanwezige 16S rRNA genen. De resultaten gaven inderdaad aan dat er bacteriegroepen zijn die specifiek serum IgG binden. De IgG antistofreactie was vooral gericht tegen dunne darmbacteriën, zoals *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* en *Veillonella*. Verder was het gericht tegen pathosymbionten zoals *Ruminococcus gnavus* en *Enterobacteriaceae*. Aan de andere kant was er zeer weinig IgG immuunreactie tegen heilzame en anti-inflammatoire bacteriën, zoals *F. prausnitzii* en *Roseburia*. Hierbij werden er geen verschillen gevonden in antistofreactie tegen darmbacteriën van serum afkomstig van patiënten met de ziekte van Crohn of colitis ulcerosa. De immuunreactie tegen pathosymbionten is te verwachten, maar dat ook anderen commensalen en zelfs dunne darmbacteriën reageren is onverwacht en dit kan misschien nieuw licht werpen op de ontstaansgeschiedenis van chronische inflammatoire darmziekten.

Nederlandse Samenvatting

In **Hoofdstuk 8** wordt naast een samenvatting van het proefschrift ook vooruitgekeken naar welk onderzoek er nu moet volgen om de relatie tussen de darmmicrobiota en chronische darmontsteking te ontrafelen. Zoals bij elk wetenschappelijk onderzoek zijn specifieke vragen beantwoord, maar roept het ook weer vele nieuwe vragen op.

Er zou meer onderzoek moeten komen naar de heilzame bacterie *F. prausnitzii*. De fylogenie van de verschillende stammen moet onderzocht worden om te kunnen bepalen welke stammen het belangrijkste zijn bij de kolonisatie van de darm, bij het anti-inflammatoire effect en de vorming van boterzuur. Vooral de ontcijfering van de gekoloniseerde voedseldeeltjes kan interessante aanwijzingen geven over stimulering van faecalibacteriën in de darm. Ook het mechanisme achter het effect van riboflavine op de faecalibacterie-populaties is interessant en kan ons verder helpen in de ondersteuning van een gezonde darmmicrobiota. Verder moet de werking van heilzame bacteriën op het immuunsysteem verder onderzocht worden in het HoxBan systeem. In dit systeem kan nu de rol van vitaminen, voedingsvezels maar ook de rol van pathosymbionten onderzocht worden, wat ons kan helpen de complexe gastheer-microbiota interactie te doorgronden.

De rol van de genen op onze darmmicrobiota en op ontsteking kan ook *in vitro* in het HoxBan systeem onderzocht worden. Daarbij kunnen ook andere genen dan *ATG16L1*, zoals *NOD2*, en naar andere celtypen zoals monocyt en neutrofielen betrokken worden.

Onderzoek naar het effect van omgevingsfactoren, zoals roken, dieet en hygiëne op ons microbioom zal ons nieuwe inzichten geven in de ontwikkeling van chronische darmontsteking. De resultaten beschreven in dit proefschrift helpen om nieuwe strategieën op het gebied van dieet of farmacologie te ontwikkelen voor het behandelen van chronische darmontsteking en/of te voorkomen dat er opnieuw ontsteking ontstaat in de darmen van individuen die vatbaar zijn voor de ontwikkeling van IBD.

REFERENTIES

1. Luckey TD. Introduction to intestinal microecology. Am J Clin Nutr 1972;25:1292-1294.
2. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:6578-6583.
3. Van den Abbeele P, Van de Wiele T, Verstraete W, Possemiers S. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept. FEMS Microbiol Rev 2011;35:681-704.
4. Zoetendal EdV, Willem. Effect of diet on the intestinal microbiota and its activity. Curr Opin Gastroenterol 2014;30:189-195.
5. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. Gut 2001;48:198-205.

Appendices

6. Benson AK, Kelly SA, Legge R, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:18933-18938.
7. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008;320:1647-1651.
8. Leone V, Chang EB, Devkota S. Diet, microbes, and host genetics: the perfect storm in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 2013;48:315-321.
9. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JL. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-1920.
10. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vaneecoutte M, Doerffel Y. Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:147-161.
11. Harmsen HJ, Pouwels SD, Funke A, Bos NA, Dijkstra G. Crohn's disease patients have more IgG-binding fecal bacteria than controls. *Clin Vaccine Immunol* 2012;19:515-521.
12. Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, et al. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:653-660.
13. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16731-16736.
14. Ulluwishewa D, Anderson RC, Young W, et al. Live *Faecalibacterium prausnitzii* in an apical anaerobic model of the intestinal epithelial barrier. *Cell Microbiol* 2014;.
15. Khan MT, Duncan SH, Stams AJ, van Dijk JM, Flint HJ, Harmsen HJ. The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases. *ISME J* 2012;6:1578-1585.
16. Vital M, Howe AC, Tiedje JM. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *MBio* 2014;5:e00889-14.
17. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;491:119-124.
18. Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, et al. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:179-184.
19. Rehman A, Sina C, Gavrilova O, et al. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 2011;60:1354-1362.
20. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39:207-211.

Nederlandse Samenvatting

21. Massey DC, Parkes M. Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease. *Autophagy* 2007;3:649-651.
22. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007;39:596-604.
23. Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 2009;5:527-549.
24. Neut C, Bulois P, Desreumaux P, et al. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:939-946.
25. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996;38:365-375.
26. Shim JO. Gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 2013;16:17-21.

Appendices

ACKNOWLEDGEMENTS

APPENDICES

First and foremost I wish to express my special appreciation and thanks to my supervisor Dr. Hermie Harmsen. Dear Hermie, you have been a tremendous mentor for me who never faced me as a boss. I would like to thank you for all the things you have done for me, encouraging my research progress and being there all the time with your honest and friendly manner which allowed me to develop my skills. Your creative ideas on my research topics have been priceless and helped me to grow as a PhD student in your lab. I hope I can have your helpful corrections on my Dutch like I had it for my English! Thank you for providing me with the opportunity to continue my research career in a field that I like a lot. I hope that we can make a wonderful outcome of it.

A special thanks goes to my promotors Prof. Dr. Gerard Dijkstra and Prof. Klaas Nico Faber. Dear Gerard, you were/are always full of new and brilliant ideas which you did not hesitate to share with me. I will always appreciate your supportive presence during my PhD. Your honorable attitude and optimistic views were always there in the most difficult times of my stay here and helped me in confronting the problems and assuring that I can and should continue my progress.

Dear Klaas Nico, despite the fact that I started to be your student somewhat later during my PhD, I always benefited from your positive energy, fine ideas and your sharp critics which shaped the results to become more appealing which I think ended up in some great outcomes.

I would also like to thank my reading committee members, Prof. N.A. Bos, Prof. G.T. Rijkers, and Prof. H. Flint for sparing precious time and evaluating my thesis.

My special thanks go to Jan Marten Van Dijk for his friendly attitude and wonderful ideas. I would like to thank all the members of the MMB, Molbac and MDL labs for all their support for the experiments. Erwin Rangs and Carien Bus, thank you very much for all the helps and assistance in MMB lab, especially in the first year of my stay here (dear Carien, an especial dankje for being my paranymph). Special thanks to Tjasso Blokzijl from MDL lab for his help and energetic manner.

A warm thank you for all the residents of “de Brug” specially Marchine, Anke Caroline and Anja for their warm, friendly smiles and helps. A Dankje for the de Brug Coffee table comitee, Patrick, Zadrach, Gepke, and Gidiony for the fun talks around the table.

I would like to also thank all lunch group mates, Jan-Willem (It was pleasant to have you in the office, thank you for all the help) Silvia, Kai, Mithila, Tjibbe and Mariano for the nice chats we had as well as all the office mates, Rudi, Marcus, Tanweer and Linda for their help during my PhD.

Several Gut Ecology group students, Kilian, Jele, Emmelien, Nicole, Annelieke and Geisje assisted me with experiments in our lab. Thank you very much for all the help. Special thanks for Annelieke, for finding typos in the latest draft of the thesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

A big “dametun garm” to all my Iranian friends in Groningen. Dear Amir Hossein and Sara, you were my first friends here in Holland and I am very happy that we kept this valuable friendship during these years and I hope we can keep it forever. Dear Mahdi and Fahimeh thank you very much for being my friend without any expectations and having me in all those difficult times, especially in the cold winter times ;). Dear Nima and Shaghayegh, thanks a lot for sharing your time and happiness with me in all those years I was your “Hamsayeh”. Dear Salomeh, thanks for all the informative help and delicious foods you prepared in the past years. A big thanks to my dear friends from Tabriz, Mojtaba, Sanam and Taha for all the warm moments we had here especially in the very difficult moments within the past couple of months, thanks a lot for being there. I would like to thank “Shelem” team members of Groningen especially Nima, Saleh and Pouya for all the fun time we had together, I hope we can reunite the team and compete very soon again. Dear Saleh and Fariba I wish you very happy moments in your life. Dear Reza, thank you very much for the nice friendship and great hospitality you had in Tango and your place. Dear Mohammad Reza and Saiedeh, thanks a lot for all the fun moments we had together. Mandana and Mehran, thank you for all the fun parties we had in Groningen and I wish you a very happy life. Dear Mehdi and Parisa, it is pity that we got to know each other just recently, many thanks for your generous help in the few past months. Dear Golnar, thank you for your positive comments and helps about my project. I would like to thank all other Iranian friends here in Groningen, Reza, Vahid and Niloofar, Karamah, Azadeh, Solmaz, Negin, Paria, Marzieh, Rieks, Ali and Shabnam, Hadi and Soheila, Esmail and Sahar, Ahmad, Mehran, Ali and all those friends of which I forgot to mention their names here.

Dear Visnja, I will always remember the coffee-cappuccino breaks that we had in UMCG.

During my stay In *Van Houtenlaan* I met wonderful people from different countries, which gave me the opportunity to know the world better and make a great friendship. Thanks a lot for all the memorable moments. Among those I would like to mention, my dear neighbors from the 7th floor, Vassiliki, Marte and Richard, thanks a lot for helping me.

A special debt is owed to Mr. Mohammad Salek Nejat and Nejati Industrial Group for all the help and support I had from them.

I would also like to thank Prof. Dr. Peter Weber, Dr. Jonas Wittwer and Dr. Robert Steinert from DSM Nutritional Products Ltd. for their financial support of the thesis and bringing the opportunity for upcoming research projects.

APPENDICES

Words cannot express how grateful I am to my family. My sincerest thanks to my parents in law and my little sister Shabnam, for all the support and warm energy that I had in the recent year.

My dear parents, Haji va Haj khanum! without your helps and all the sacrifices that you've made on my behalf it was not possible to achieve here. I was not there when you needed me and you were there all the times that I needed you. Your prayer for me was what sustained me thus far. My dear sisters and brothers, Gity, Mahin, Kamran and Mehran, it would have been much more difficult without your help and support here and back home, I miss you all a lot.

At the end I would like express my appreciation to my beloved wife Elnaz. My honey, your support, encouragement, quiet patience and unwavering love were the best support I ever had. Your tolerance of my absence and our separation is a testament in itself of your unyielding devotion and love. Thank you very much for all of it.

Mehdi
Groningen
January 2015

LIST OF PUBLICATIONS

APPENDICES

Sadaghian Sadabad M, Regeling A, de Goffau MC, Blokzijl T, Weersma RK, Penders J, Faber KN, Harmsen HJ, Dijkstra G.

The *ATG16L1-T300A* allele impairs clearance of pathosymbionts in the inflamed ileal mucosa of Crohn's disease patients.

Gut. 2014 Sep 24. pii: gutjnl-2014-307289. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307289

Marzorati M, Vanhoecke B, De Ryck T, **Sadaghian Sadabad M**, Pinheiro I, Possemiers S, Van den Abbeele P, Derycke L, Bracke M, Pieters J, Hennebel T, Harmsen HJ, Verstraete W, Van de Wiele T.

The HMI™ module: a new tool to study the Host-Microbiota Interaction in the human gastrointestinal tract in vitro.

BMC Microbiol. 2014 May 22;14:133. doi: 10.1186/1471-2180-14-133.

van der Kooi-Pol MM, **Sadaghian Sadabad M**, Duipmans JC, Sabat AJ, Stoberneck T, Omansen TF, Westerhout-Pluister GN, Jonkman MF, Harmsen HJ, van Dijk JM.

Topography of distinct *Staphylococcus aureus* types in chronic wounds of patients with epidermolysis bullosa.

PLoS One. 2013 Jun 25;8(6):e67272. doi: 10.1371/journal.pone.0067272. Print 2013.

PMID: 23825650

Hermie J.M. Harmsen, M. Tanweer Khan, **Sadaghian Sadabad M** and Jan Maarten van Dijk.

The use of riboflavin for the selective stimulation of *Faecalibacterium prausnitzii* in the human gut and the stabilization of a synbiotic(probiotic/prebiotic) formulation of the same oxygen sensitive *F. prausnitzii*.

European patent application No. 12190948.5 Rijksuniversiteit Groningen